取扱説明書

リガンド固定化用アフィニティー担体 セルファイン ホルミル　Cellufine Formyl

アフィニティークロマトグラフィーは生物学的な特異的親和性を利用するために、ゲルろ過やイオン交換に比較して高い精製率を得ることができます。従来、CNBr活性化や活性化エステル(NHS 活性化)のアガロースが使用されてきました。しかし、アガロースは物理的強度が弱い、CNBr は毒性が強い、CNBr 活性化と活性化エステルは不安定である等の欠点があります，これらの欠点を改良した新しいアフィニティー担体がセルファインーホルミルです。

1 一般的性質

セルファインーホルミルはホルミル基(アルデヒド基)を持つ、多孔性の真球状セルロースゲルです。

1. セルロースゲルの多孔性は、セファロース4Bに匹敵します。
2. 真球状で硬く、高流速で工業的スケールでも使用できます。
3. 第1級アミノ基をもつリガンドを固定化できます。
4. 固定化したリガンドは安定で、脱離することはありません。
5. 固定化は従来の方法よりも高濃度で、しかも、結合するリガンド量をコントロールできます。
6. 穏和な条件で、短時間で･カップリングできます。

Table 1.　Characteristics　of　Cellufine Formyl

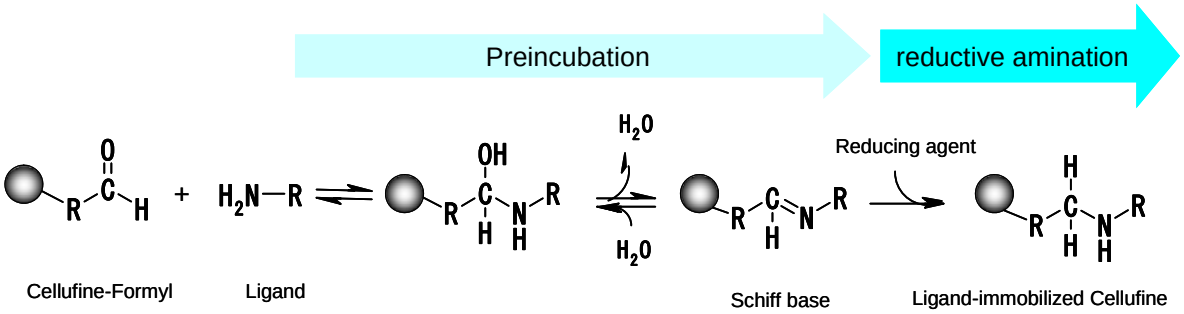
Base gel	porous cellulose spherical beads
Size	125-210 μm
Activated group	Formyl (aldehyde)
Formyl group conc.	10 μmol/ml-gel
Delivery condition	0.2M Acetate buffer,pH3.0 containing 0.01% 2,2-dithio-bis(pyridine-1-oxide)

2 カップリングの機構

セルファインーホルミルと第1級アミノ基をもつリガンドとのカップリングは次式のように進みます。

まずシッフ塩基が生成されますが、これは逆反応と平衡関係にあるので、還元剤で安定化する必要があります。

還元剤としては、水素化シアノホウ素ナトリウム　($NaCNBH_3$)、トリメチルアミンボラン($(CH_3)_3NBH_3$)、水素化ホウ素ナトリウム($NaBH_4$)が使用できます。



3 使用方法

1. 用意するもの

I. 材料

セルファインホルミル、還元剤、リガンド

表1 各種還元剤の比較

	長所	短所	摘要	使用pH
SCBH (CAS 25895-60-7) (Sodjum cyano borohydride) $NaCNBH_3$	タンパク質、アルデヒドに対し、ほとんどダメージがない。	毒物	ドラフト内使用。 廃液処理は確実に行う。	pH4 以上
TMAB (CAS 75-22-9) (Trimethylamjneborane) $(CH_3)_3NBH_3$	毒性が弱い。 還元力が弱く、タンパク質に与えるダメージがほとんどない。	水に溶けにくい。 (水に対する溶解度 1.3%)	リガンドとセルファインーホルミルをあらかじめ1～2時間振とう後、TMABを加える。	pH5 以上
SBH (CAS 16940-66-2) (Sodiumborohydride) $NaBH_4$	遊離アルデヒドのブロッキングが不必要。毒性が弱い。	還元力が強いためホルミル基の不活化を起こす。特殊タンパク質(S-S 結合を含む等)には使用不可。	TMABと同じ。	pH7 以上

＊SCBH には微量の SBH が含まれていますので、特に還元に弱いリガンドを使用する場合は、参照文献 3), 9)を参考に精製して下さい。以上の様に、各種還元剤により一長一短があります。リガンドの性質、使用量、経済性を考慮して選択して下さい。

II. 緩衝液

① カップリング緩衝液 ： 第1級アミノ基を含まない緩衝液、pH4～11 の範囲で、0.2M のリン酸緩衝液、酢酸緩衝液、HEPES 緩衝液、等

② ブロッキング緩衝液 ： 0.2M、Tris-HCI 緩衝液、pH7.0 または1M glycine ethyl ester か1M ethanolamine を含む 0.2M リン酸緩衝液、pH7.0

2. カップリング方法 （ゲル1mlの調製法）

I. 洗浄

① セルファインホルミルの容器を良く振って、均一スラリーにする(およそ50%スラリーになる)。

② 2mlを計りとり、デカンテーションかろ過洗浄で酢酸臭がなくなるまで、純水で洗浄する。

③ 反応容器にゲルを入れ、直ぐにカップリング操作を開始する。

※スラリーを2ml以上とり純水で洗浄後、吸引ろ過によって15分程度放置したゲルケーキは0．7～0．8gがおよそ1ml になります。

II. カップリング

① リガンドを含んだカップリング緩衝液を調製する。

② 1mlのゲルに対して1～2倍量の割合で反応させる。

③ 反応は振盪、あるいは緩やかなマグネチックスタラーでの攪拌で、リガンドの安定性に適した温度で反応させる。

④ 1時間～2時間反応後に、還元剤(7mg)を加え、さらに2～8時間反応する。(還元剤は5～10mgを使用する。粉末の代わりに、50～100mg／mlの還元剤の溶液を0．1ml加えても良い)

⑤ デカンテーションかろ過洗浄によって、反応液をゲルから取り除き、およそ20mlカップリング緩衝液で数回洗浄する。必要であれば、回収した液中に残存するリガンド濃度を定量する。(残存リガンドと反応前リガンドの濃度差からゲルにカップリングしたリガンド量を求める事ができる)

⑥ 洗浄したゲルにブロッキング緩衝液を2mlと還元剤(7mg)を加えて2時間反応させる。(還元剤が SBH の場合はブロッキング操作は不用)

⑦ デカンテーションかろ過洗浄によって、反応液をゲルから取り除き、カップリング緩衝液や純水で洗浄する。(洗浄にはおよそ20mlの緩衝液か純水を使用し数回に分けて洗う)

⑧ リガンドに対して適当な緩衝液に懸濁し、低温保存する。

カップリング材料、操作のまとめ （ 1mL ゲル当たりの必要量 ）

1	セルファインホルミル	保存液を洗浄除去したもの 1mL (0. 7～0. 8g-wet-g)
2	カップリング液	リガンドが含まれたカップリング緩衝液 液量は1～2ml(リガンド濃度は4カップリングの条件参照
3	プレインキュベーション	ゲルとカップリング液を混ぜてから1～2時間反応させる。 (SCBH を使用する場合はプレインキュベーションは必須では無い)
4	還元剤	5～10mg を加える。 (水溶液、あるいはバッファーに還元剤を溶解して加えても良い)
5	カップリング	2～16時間 温度はリガンドの安定性に依存する。
6	洗浄	ろ過洗浄、デカンテーションで反応液を除去。カップリングバッファー20mlで数回に分けて洗浄する。反応液と洗浄液を回収して、リンガンド濃度を定量し、カップリング量を測定する事ができる。
7	ブロッキング	洗浄したゲルに 1～2ml のブロッキング液を加えて、還元剤(4)と同じ量を加える。2時間程度反応させる。
8	洗浄	ろ過洗浄、デカンテーションで反応液をゲルから取り除き、カップリング緩衝液や純水で洗浄する。(洗浄にはおよそ20mlの緩衝液か純水を使用し数回に分けて洗う)

Ⅲ アフィニティークロマトグラフィーの実施

① リガンド固定化ゲルを40～50%程度のスラリーにし、カラムに流し込む。

② 平衡化バッファーを流し、ゲルベッドを形成させる。カラムの取扱説明書に従って、ベッドサポートなどをセットして、さらに平衡化を進める。

③ サンプルを流し目的物質を吸着させ、吸着バッファーを流してベッドの残った不純物を洗浄する。
※アフィニティークロマトグラフィーの用いる平衡化バッファー、溶出バッファーは、主にリガンドの性質に依存する。

④ 不純物を十分洗浄した後、溶出バッファーを流して、目的物質を回収する。

⑤ 洗浄・再生:セルファイン自体、酸、アルカリ、有機溶媒等に対し安定であるため、洗浄、再生条件はリガンドの安定性に依存します。特にリガンドがタンパク質の場合、過酷な条件は使用できません。しかし、洗浄、再生がうまくいかないと、繰り返し使用しているうちに、汚れが蓄積し分離に影響する可能性があります。このため、ゲルを長時間反復使用する場合は、洗浄、再生を確実に行う必要があります。リガンドが安定な酸性緩衝液とアルカリ性緩衝液の両方あるいは一方で洗浄します。

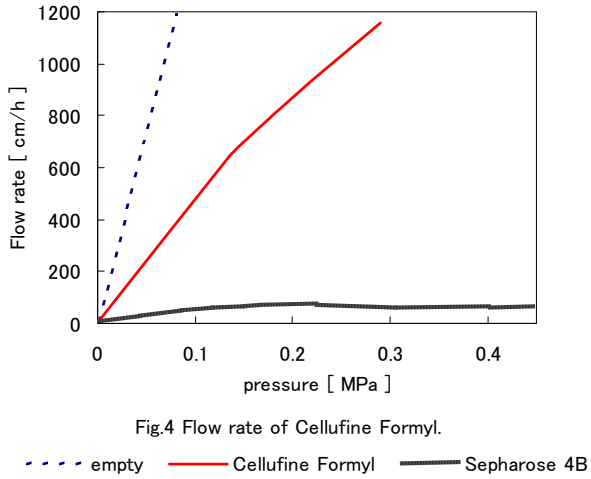


Fig.4 Flow rate of Cellufine Formyl.

4 カップリングの条件

アフィニティークロマトグラフィーの担体の調製は、カップリング時のリガンド濃度、温度、pH 等の影響を受けるため、スケールアップや効率の良いアフィニティークロマトグラフィーを考える場合、最適条件を検討する必要があります。以下に各条件について述べます。

1. カップリング時のリガンド濃度

図 1. を参照下さい。

①高濃度のリガンド結合量(約 15mg/mLgel 以上)を得たい。

②目的物質が低分子であり、単位ゲル当りの目的物質の回収量を多くしたい

③リガンドが安く多量に干に入る。

⇒ 高濃度のカップリング溶液(20mg/mL 以上)を使用する

① ターゲット同志の立体障害が考えられ、低濃度のリガンド結合量(約 15mg/mLgel 以下)を得たい。

②リガンドが高価なため、カップリングに用いた量をほぼ 100%利用したい。

⇒ 低濃度のカップリング溶液(20mg/mL 以下)を使用する

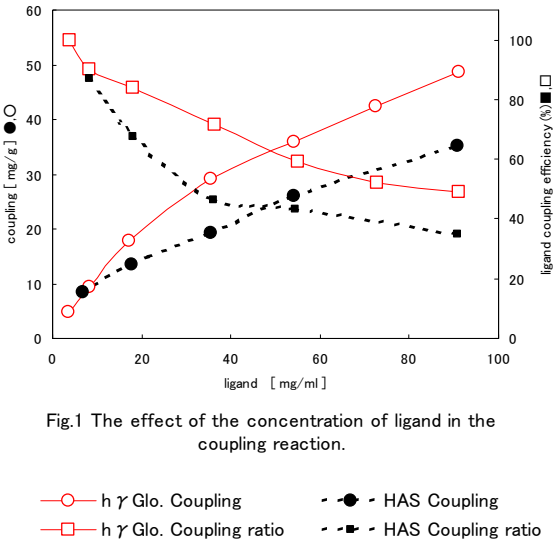

coupling [mg/g] ●○
ligand coupling efficiency (%) ■□
ligand [mg/ml]
h γ Glo. Coupling
h γ Glo. Coupling ratio
HAS Coupling
HAS Coupling ratio

Fig.1 The effect of the concentration of ligand in the coupling reaction.

2 カップリング緩衝液の pH

図2. を参照下さい。

タンパク種により最適 pH が異なります。リガンドの pH 安定性、利用率を考慮して選択してください。一般に、等電点より高い pH を用いることで、高い利用率が得られます。

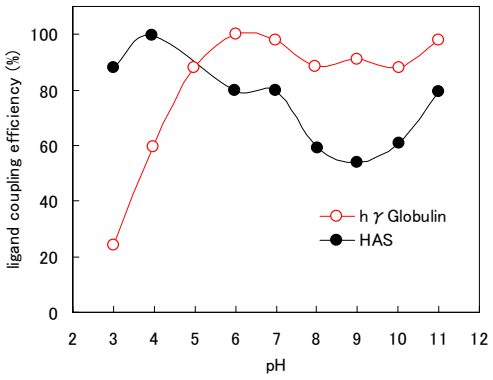


Fig.2 The effect of pH of coupling buffer on the amount of ligand coupled to the gel

3 カップリング時の反応温度とインキュベーション時間

図3. を参照下さい。

① 高温ではカップリング量が多くなりますが、リガンドがタンパク質の場合変性する可能性も大きくなります。リガ`ンドに適した温度を選んで下さい。

②· リガンドが変性し易いか、あるいは低濃度のリガンド結合量(約 10mg/mLgel)で良い場合は、インキュベーション時間は2～4時間で充分です。

③· きるだけ多量のリガンドを結合させたい場合、4時間以上の振とう時間が望ましい。

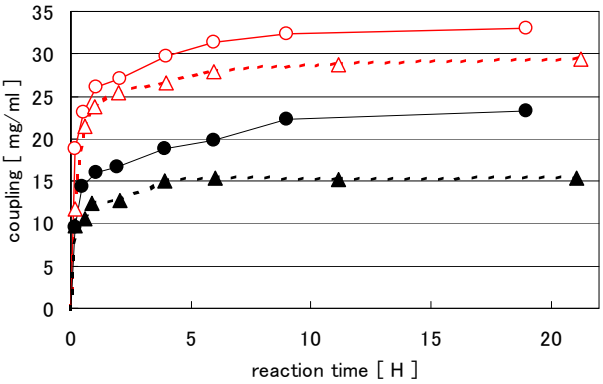


Fig3 The relation between the time for coupling reaction and the quantity of coupled protein.

4 プレインキュベーション時間

より多くのリガンドをカップリングさせるためには、還元剤を添加するまでに、できるだけシッフ塩基を形成させておく必要があります。プレインキュベーション時間は 1.5～2.5 時間必要です。

５ 水酸化シアノホウ素ナトリウム(SCBH)の廃液処理方法

SCBH の取扱や廃棄方法は、製造企業や試薬販売会社の MSDS を参照ください。下記に SCBH の処理方法を参考までに記載します。

注意事項

⑴操作はドラフト内で行う。

方法ー1

⑴ SCBH 使用後の反応液と一次洗浄液をビーカーに入れる。

⑵ 次亜塩素酸カルシウムの強アルカリ溶液に、侵絆しながら加える。この時、過剰のＮａＯＨと次亜塩素酸カルシウムが残存するようにする。

⑶ 24 時間放置した後、廃液として処分する。

方法ー2

⑴ SCBH 使用後の反応液と一次洗浄液をビーカーに入れる。

（２）ＮａＯＨ溶液で･アルカリ性にする。

⑶ これに過剰の硫酸鉄（II）溶液を加え、１時間放置した後、廃液して処分する。

（オーダーインフォメーション）

製品番号	品名	包装
676 944 324	セルファイン ホルミル	10ml
19853	セルファイン ホルミル	50ml
19854	セルファイン ホルミル	500ml

JNC株式会社

ライフケミカル推進室

〒100-8105 東京都大手町二丁目２番１号

電話 03-3243-6150　FAX 03-3243-6219

E-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp

URL: http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine